



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/11, 15/86, C07H 21/02, A61K 31/70	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/18223
		(43) Date de publication internationale: 6 juillet 1995 (06.07.95)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01536

(22) Date de dépôt international: 27 décembre 1994 (27.12.94)

(30) Données relatives à la priorité:
93/15798 29 décembre 1993 (29.12.93) FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE [FR/FR]; 57, rue Cuvier, F-75005 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GIOVANNANGELI, Carine [FR/FR]; 16, rue Larrey, F-75005 Paris (FR). HELENE, Claude [FR/FR]; 14, quai d'Orléans, F-75004 Paris (FR).

(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).

(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: GENE EXPRESSION CONTROL

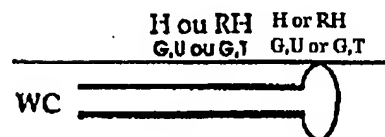
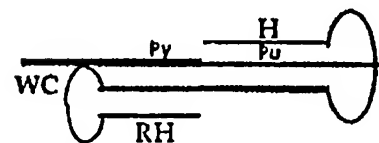
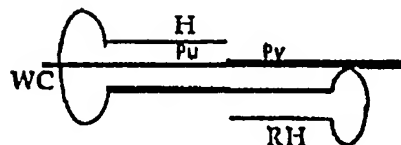
(54) Titre: CONTROLE DE L'EXPRESSION DE GENES

(57) Abstract

The present invention relates to new vectors, pharmaceutical compositions containing them, and their therapeutical uses. More particularly, it relates to double strand DNA molecules coding for an RNA forming a triple helix with a single strand target nucleic acid. Said molecules act very selectively and efficiently on the expression of genes.

(57) Abrégé

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant, et leurs utilisations thérapeutiques. Plus particulièrement, elle concerne des molécules d'ADN double-brin codant pour un ARN formant une triple hélice avec un acide nucléique-cible simple-brin. Ces molécules agissent de manière très sélective et efficace sur l'expression de gènes.



Best Available Copy

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

CONTROLE DE L'EXPRESSION DE GENES

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant, et leurs utilisations thérapeutiques. Plus particulièrement, elle concerne de nouveaux vecteurs permettant d'agir, de manière
5 très sélective et très efficace, sur l'expression de gènes.

La régulation de l'expression de gènes-cible au moyen d'oligonucléotides constitue une approche thérapeutique en développement croissant. Cette approche repose sur la capacité des oligonucléotides à s'hybrider spécifiquement à des régions complémentaires d'un acide nucléique, et à inhiber ainsi spécifiquement l'expression
10 de gènes déterminés. Cette inhibition peut intervenir soit au niveau traductionnel (oligonucléotide anti-sens) soit au niveau transcriptionnel (oligonucléotide anti-gène).

Les oligonucléotides anti-sens sont des séquences nucléiques capables de s'hybrider sélectivement avec des ARNs messager cellulaires-cible, pour inhiber leur traduction en protéine. Ces oligonucléotides forment avec l'ARNm-cible, de manière
15 locale, des régions double-brin, de type ARN/ARNm ou même ADN/ARNm, par interaction de type Watson-Crick classique. Il peut s'agir par exemple d'oligonucléotides synthétiques, de petite taille, complémentaires d'ARNm cellulaires, et qui sont introduits dans les cellules-cible. De tels oligonucléotides ont par exemple été décrits dans le brevet n° EP 92 574. Il peut également s'agir de gènes anti-sens
20 dont l'expression dans la cellule-cible génère des ARN complémentaires d'ARNm cellulaires. De tels gènes ont par exemple été décrits dans le brevet n° EP 140 308.

Plus récemment, un nouveau type d'oligonucléotides capables de réguler l'expression de gènes-cible a été mis en évidence. Ces oligonucléotides ne s'hybrident pas avec les ARNm cellulaires, mais directement avec l'ADN génomique en double-
25 brin. Cette nouvelle approche repose sur la mise en évidence que certains oligonucléotides sont capables d'interagir spécifiquement dans le grand sillon de la double-hélice d'ADN pour former localement des triple-hélices, conduisant à une inhibition de la transcription de gènes-cible. Ces oligonucléotides reconnaissent sélectivement la double-hélice d'ADN au niveau de séquences
30 oligopurine.oligopyrimidine, c'est-à-dire au niveau de régions possédant une séquence oligopurique sur un brin et une séquence oligopyrimidique sur le brin complémentaire, et y forment localement une triple-hélice. Les bases du troisième brin (l'oligonucléotide) forment des liaisons hydrogène (liaisons Hoogsteen ou Hoogsteen inverse) avec les purines des paires de bases Watson-Crick. Les
35 oligonucléotides anti-gène peuvent contenir les bases suivantes :

- thymidine (T), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double-brin (Rajagopal et al, Biochem 28 (1989) 7859);

- adénine (A), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double-brin;

5 - guanine (G), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double-brin;

- cytosine protonée (C+), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double-brin (Rajagopal et al précitée);

10 Des oligonucléotides anti-gène ont notamment été décrits par Hélène dans Anti-Cancer drug design 6 (1991) 569.

La présente invention décrit une nouvelle approche pour le contrôle de l'expression de gènes-cible. Elle réside plus particulièrement dans la mise en évidence qu'il est possible de produire génétiquement *in vivo* des ARN thérapeutiques capables de former des triple-hélices avec des acides nucléiques-cible simple-brin. 15 Préférentiellement, elle réside dans la production génétique *in vivo* d'ARN thérapeutiques capables de former des triple-hélices avec des cibles ribonucléiques.

L'invention concerne notamment les séquences d'ADN double-brin codant pour de tels ARN thérapeutiques. Elle concerne également les vecteurs utilisables pour la production *in vivo* de ces ARN thérapeutiques, notamment dans le cadre d'une 20 thérapie génique. Elle concerne aussi les compositions pharmaceutiques comprenant ces ADN double-brin ou ces vecteurs.

Un autre aspect de l'invention réside dans un procédé de régulation de l'expression de gènes cellulaires par transformation de cellules-cible au moyen d'un vecteur tel que mentionné plus haut.

25 Plus particulièrement, la présente invention concerne donc un ADN double-brin codant pour un ARN capable de former une triple-hélice avec un acide nucléique cible simple-brin.

Les ADN double-brin de l'invention codent plus particulièrement pour des ARN composites comprenant au moins :

30 - une première région capable de former une double-hélice avec l'acide nucléique simple-brin ciblé ou avec une partie de celui-ci,

- une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci, et,

35 - un ou deux bras reliant les deux régions, chacune des régions pouvant être continue ou interrompue.

Dans un premier mode particulier de mise en oeuvre de l'invention, la première région de l'ARN composite forme avec l'acide nucléique simple-brin ciblé une double-hélice par interaction de type Watson-Crick classique, puis la deuxième région forme avec cette double-hélice ou avec une partie de celle-ci une triple-hélice par liaisons hydrogène (de type Hoogsteen ou Hoogsteen inverse) (voir figures 1-4).

Dans un autre mode particulier de mise en oeuvre de l'invention, les deux régions de l'ARN composite de l'invention forment entre elles une double-hélice par appariement de type Watson-Crick, laquelle double-hélice interagit avec l'acide nucléique simple-brin ciblé par liaisons hydrogène (de type Hoogsteen ou Hoogsteen inverse), formant ainsi une triple-hélice (voir figure 5).

L'acide nucléique ciblé simple-brin peut être un ARN, tel que par exemple un ARN messager (ARNm), un ARN de transfert (ARNt), un ARN ribosomique (ARNr) ou un ARN viral. Il peut également s'agir d'un ADN simple-brin, apparaissant par exemple lors de la réplication de l'ADN double-brin ou d'une région de l'ADN localement ouverte par nature.

La présente invention est particulièrement adaptée au contrôle de l'expression de virus, notamment de virus à ARN ou à ADN en simple-brin, aux différentes étapes du cycle viral. Différents acides nucléiques simple-brin peuvent en effet constituer des cibles pour les ARN thérapeutiques de l'invention, et notamment

- l'ARN viral (dans le cas des virus à ARN, tels que par exemple rétrovirus, poliovirus, virus de la grippe, etc) : L'action des ARN thérapeutiques de l'invention sur l'ARN permet d'inhiber la transcription inverse, c'est-à-dire d'agir au niveau d'une étape précoce du cycle viral.

- l'ADN proviral (dans le cas des virus à ARN) ou viral : Les ARN thérapeutiques de l'invention peuvent agir avant ou après une intégration de l'ADN viral ou proviral dans le génome de la cellule infectée. L'interaction se produit après ouverture locale de la double-hélice d'ADN, et les triple-hélices ainsi formées sont beaucoup plus stables que les triple-hélices classiques (impliquant un oligonucléotide anti-gène).

- l'ARNm viral : L'action des ARN thérapeutiques de l'invention sur les ARNm viraux permet d'inhiber la traduction et l'expression de protéines virales.

Plus particulièrement, les ARN de l'invention sont capables de former des triple-hélices avec les acides nucléiques simple-brin ciblés, au niveau de régions constituées préférentiellement de bases puriques (A et G : région polyPu), ou de bases pyrimidiques (T/U et C : région polyPy), ou de bases T/U et G (région polyT/U,G).

Ainsi, lorsque l'acide nucléique ciblé (ou une région déterminée de celui-ci) est composé essentiellement de bases puriques (polyPu), l'ARN thérapeutique de l'invention peut comprendre une première région composée des bases pyrimidiques complémentaires (région Watson-Crick), un ou deux bras oligonucléotidiques, et une

5 deuxième région (région Hoogsteen) composée des bases U, C et/ou G, qui interagissent avec les bases puriques de la double-hélice formée selon l'appariement mentionné ci-après : les bases C et G sont capables de former des liaisons hydrogène avec la guanine des doublets G.C; la base U est capable de former des liaisons hydrogène avec l'adénine des doublets A.T ou A.U.

10 Dans ce mode de réalisation, l'ARN thérapeutique de l'invention forme une boucle autour de l'acide nucléique-cible ou une partie de celui-ci, selon la configuration représentée sur la figure 1a.

Lorsque l'acide nucléique-cible (ou une région déterminée de celui-ci) est composé essentiellement de bases pyrimidiques (polyPy), l'ARN thérapeutique de

15 l'invention peut comprendre une première région composée des bases puriques complémentaires (région Watson-Crick), un ou deux bras oligonucléotidiques, et une deuxième région (région Hoogsteen) composée des bases U et G ou A et G, qui interagissent avec les bases puriques de la double-hélice formée selon l'appariement mentionné ci-après : la base G est capable de former des liaisons hydrogène

20 (Hoogsteen inverse) avec la guanine des doublets G.C; les bases U et A sont capables de former des liaisons hydrogène avec l'adénine des doublets A.T ou A.U.

Dans ce mode de réalisation, l'ARN thérapeutique de l'invention forme une boucle parallèle à l'acide nucléique-cible, selon la configuration représentée sur la figure 2.

25 Lorsque l'acide nucléique-cible (ou une région déterminée de celui-ci) est composé essentiellement de bases T/U,C ou T/U,G, l'ARN thérapeutique de l'invention peut comprendre une première région composée des bases puriques complémentaires (région Watson-Crick), un ou deux bras oligonucléotidiques, et une deuxième région

30 composée des bases pyrimidiques complémentaires des bases puriques (région également Watson-Crick), les 2 régions de l'ARN thérapeutique formant une double-hélice Watson-Crick dont le brin purique interagit avec l'acide nucléique-cible, par formation de liaisons Hoogsteen ou Hoogsteen inverse.

Dans ce mode de réalisation, l'ARN thérapeutique de l'invention forme une boucle parallèle à l'acide nucléique-cible, selon la configuration représentée sur la

35 figure 5.

Il est entendu que, selon la composition de l'acide nucléique ciblé simple-brin choisie, l'homme du métier peut définir d'autres séquences d'ADN double-brin de l'invention, basées sur l'appariement des doublets Watson-Crick et Hoogsteen ou Hoogsteen inverse.

5 Le ou les bras reliant les deux régions des ARN thérapeutiques de l'invention sont des séquences oligonucléotidiques qui peuvent comporter toute base composant les ARN (A, U, G ou C). La séquence du bras ne doit pas, de préférence, être susceptible de s'apparier elle-même avec l'acide nucléique ciblé, pour ne pas perturber la formation de la triple-hélice locale. La longueur de ce bras peut être adaptée par
10 l'homme du métier en fonction de l'acide nucléique ciblé. Généralement, elle est comprise entre 3 et 6 bases, de préférence entre 3 et 5.

Par ailleurs, dans un mode particulier de réalisation, les ADN double-brin de l'invention peuvent coder pour des ARN composites comprenant 2 bras oligonucléotidiques permettant la formation de deux boucles autour de, et/ou,
15 parallèles à, l'acide nucléique ciblé simple-brin. De tels ARN composites présentent des propriétés particulièrement avantageuses :

- Ils permettent tout d'abord d'augmenter encore la stabilité de la triple-hélice formée, ainsi que son efficacité thérapeutique, en raison d'un encombrement stérique encore plus important (Cf figures 1b, 1c, 3 et 4).
- 20 - Ils permettent de cibler des acides nucléiques simple-brin au niveau de régions oligopuriques ou oligopyrimidiques interrompues respectivement par des bases pyrimidiques ou puriques, en interrompant la région Hoogsteen ou Hoogsteen inverse (Cf figures 3a et 3b). Ceci permet donc d'élargir le champ d'application de ces ARN thérapeutiques à tout type de région d'un acide nucléique simple-brin.
- 25 - Ils permettent également de cibler des acides nucléiques simple-brin composés d'un enchaînement d'une région oligopurique et d'une région oligopyrimidique, et inversement (figure 4). Ceci élargit donc encore le champ d'application des ARN thérapeutiques de l'invention.

30 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'ADN double-brin code donc pour un ARN composite comprenant :

- une première région capable de former une double-hélice avec l'acide nucléique simple-brin ciblé ou avec une partie de celui-ci,
- une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-
35 hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci, et,

- 2 bras reliant chacune des deux régions à leurs extrémités (figures 1b, 1c, 3 et 4).

Dans ce mode de réalisation, l'une des 2 régions de l'ARN composite (Watson-crick (figure 1b), Hoogsteen (figure 1c et 3a) ou Hoogsteen inverse (figure 3b)) est interrompue, car elle contient le site d'initiation de la transcription.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, l'ADN double-brin code pour un ARN composite comprenant :

- une première région capable de former une double-hélice avec une région oligopurique de l'acide nucléique simple-brin ciblé,
- un bras,
- une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci,
- une troisième région, liée à la première, capable de former une double-hélice avec une région oligopyrimidique de l'acide nucléique simple-brin ciblé,
- un deuxième bras, et,
- une quatrième région, liée à la troisième, capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci (figures 4).

De préférence, les ADN double-brin de l'invention (et les ARN composites codés possèdent une longueur supérieure à 10 bases, et, plus préférentiellement, supérieure à 15 bases. Cette longueur est adaptée par l'homme du métier en fonction de la longueur de l'acide nucléique ciblé en simple-brin, de manière à assurer la stabilité, la spécificité et la sélectivité de l'ARN thérapeutique. Par ailleurs, pour améliorer la stabilité de la triple-hélice, il peut être intéressant d'allonger l'une des régions de l'ARN composite, de préférence la région formant une double-hélice.

L'ADN double-brin peut être un ADN synthétique ou semi-synthétique. Il peut être obtenu par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment au moyen de synthétiseurs d'acides nucléiques. La séquence de cet ADN est déterminée en fonction de la cible cellulaire choisie, comme indiqué ci-avant.

Avantageusement, l'ADN double-brin de l'invention comporte également des signaux permettant la transcription (la production) des ARN thérapeutiques de l'invention dans les cellules-cible. Ces signaux comprennent des séquences permettant l'initiation de la transcription (promoteurs) et, éventuellement, des signaux permettant l'arrêt de la transcription (terminateurs) ainsi que des signaux permettant la stabilisation des ARN (par exemple une queue polyA). Ces différents signaux peuvent

être constitutifs ou régulés. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes, viraux, ou de promoteurs synthétiques. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet

5 égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, RSV, HIV, etc. Il peut être particulièrement intéressant de contrôler la production de l'ARN thérapeutique dirigé contre un virus par l'infection elle-même (par exemple en utilisant le promoteur LTR du virus HIV, spécifiquement induit en présence de la protéine TAT de HIV). En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées

10 par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque l'ADN double-brin ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans un vecteur, en aval d'une telle séquence. Un système d'expression particulièrement intéressant consiste dans l'utilisation de promoteurs transcriptionnels contrôlés spécifiquement par l'ARN polymérase III. L'ARN polymérase III est en effet

15 responsable de la synthèse de petits ARN cytoplasmiques ou nucléaires présentant une stabilité élevée et qui ne sont pas traduits en protéine. Ces petits ARN sont notamment les ARNt, les ARNr, ou certains ARN viraux, tels que notamment les ARN VA de l'adénovirus. Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'ADN double-brin comprend un promoteur transcrit spécifiquement par l'ARN

20 polymérase III. Plus particulièrement, l'ADN double-brin peut être inséré dans un gène transcrit spécifiquement par l'ARN polymérase III (FR 2,687,411) ou fusionné en aval d'un tel gène (EP 387 775).

La présente invention offre de nombreux avantages par rapport aux techniques antérieures de contrôle de l'expression de gènes. En particulier, la

25 production *in vivo* d'ARN selon l'invention capables de former des triple-hélices avec des acides nucléiques cellulaires simple-brin permet d'augmenter la sélectivité des molécules thérapeutiques vis-à-vis de leurs cibles cellulaires. L'utilisation d'oligonucléotides comme agents thérapeutiques impose en effet une reconnaissance spécifique et sélective de la cible cellulaire. Ainsi, dans le cas de ras par exemple,

30 l'ARNm de l'oncogène diffère de celui du protooncogène seulement par une mutation ponctuelle. Dans ce cas, il est important que l'oligonucléotide inhibe le plus efficacement possible l'expression de l'oncogène sans toutefois affecter celle du protooncogène. Il est donc capital de disposer d'agents thérapeutiques fortement discriminants. Dans le cas des antisens classiques, chaque base de la séquence-cible est

35 reconnue par une seule base de la séquence de l'oligonucléotide, et un seul

mésappariement peut n'avoir qu'une faible influence sur la formation et la stabilité du double-brin. Mais dans le cas des molécules thérapeutiques de l'invention, une double reconnaissance est nécessaire (chaque base de la séquence-cible est reconnue par 2 bases de l'ARN thérapeutique), ce qui augmente fortement le pouvoir discriminant.

5 Les ARN thérapeutiques produits dans le cadre de l'invention possèdent également une meilleure efficacité thérapeutique que les anti-sens classiques. En effet, l'encombrement physique généré par les molécules thérapeutiques de l'invention est plus important que dans le cas des anti-sens classiques, puisque celles-ci forment une boucle autour de la cible, capable de provoquer le décrochage d'une transcriptase
10 inverse ou d'une ADN polymérase, et ainsi, susceptibles d'interagir au niveau de la traduction de l'ARNm en protéine, avec le ribosome en élongation, les enzymes et/ou autres facteurs impliqués.

Par ailleurs, en raison de la formation d'une triple-hélice (liaisons Watson-Crick et Hoogsteen ou Hoogsteen inverse), les molécules de l'invention forment avec
15 les acides nucléiques ciblés des complexes plus stables que les anti-sens classiques. Cette propriété renforce encore les avantages des molécules de l'invention qui constituent donc des agents thérapeutiques particulièrement puissants.

Enfin, la possibilité de générer *in vivo* les molécules thérapeutiques selon l'invention permet de produire ces molécules thérapeutiques à des niveaux élevés à
20 partir d'un seul ADN double-brin (ou vecteur le contenant) introduit dans la cellule cible. De plus, elle permet de générer ces molécules directement dans les compartiments cellulaires désirés de la cellule cible.

L'ADN double-brin selon l'invention peut être utilisé tel quel, par exemple après injection à l'homme ou l'animal, pour réguler l'expression d'un gène donné. En
25 particulier, il peut être injecté sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans la demande WO 90/11092. Il peut également être administré sous forme complexée, par exemple avec du DEAË-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375) ou avec des lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413). Il peut également être incorporé dans un
30 vecteur tel qu'un liposome (Fraleigh et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431) ou une nanoparticule. Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques comportant une phase aqueuse interne dans laquelle les acides nucléiques peuvent être encapsulés. La synthèse de liposomes et leur utilisation pour le transfert d'acides nucléiques est connue dans l'art antérieur (WO91/06309, WO92/19752, WO92/19730). Les
35 nanoparticules sont des particules de petite dimension, généralement inférieure à 500

nm, capables de transporter ou de vectoriser un principe actif (tel qu'un acide nucléique) dans les cellules ou dans la circulation sanguine. Les nanoparticules peuvent être constituées par des polymères comportant une majorité de motifs dégradables tels que l'acide polylactique, éventuellement copolymérisé à du polyéthylène glycol.

- 5 D'autres polymères utilisables dans la réalisation de nanoparticules ont été décrits dans l'art antérieur (voir par exemple EP 275 796; EP 520 889).

Préférentiellement, l'ADN double-brin de l'invention fait partie d'un vecteur. L'emploi d'un tel vecteur permet en effet d'améliorer l'efficacité de transfert de l'ADN double-brin dans les cellules-cible, et également d'augmenter sa stabilité dans lesdites
10 cellules, ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique durable. Par ailleurs, l'emploi de vecteurs permet également de cibler certaines populations de cellules dans lesquelles les molécules thérapeutiques doivent être produites. De plus, il est possible d'introduire plusieurs ADN double-brin dans un même vecteur, ce qui augmente également l'efficacité du traitement.

- 15 Un autre objet de l'invention concerne donc un vecteur comprenant un ADN double-brin codant pour un ARN capable de former une triple-hélice avec un acide nucléique ciblé simple-brin.

Le vecteur utilisé peut être d'origines diverses, dès lors qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules humaines. Il peut s'agir
20 aussi bien d'un vecteur plasmidique ou viral. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut être choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés (AAV), le virus de l'herpès, le cytomégalovirus, le virus de la vaccine, etc.

- A cet égard, la présente invention a également pour objet tout virus
25 recombinant comprenant, inséré dans son génome, un ADN double-brin codant pour un ARN capable de former une triple-hélice avec un acide nucléique cible simple-brin.

Des vecteurs dérivés des adénovirus, des rétrovirus, ou des AAV incorporant des séquences d'acides nucléiques hétérologues ont été décrits dans la littérature [Akli
30 et al., Nature Genetics 3 (1993) 224; Stratford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy 1 (1990) 241; EP 185 573, Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Le Gal la Salle et al., Science 259 (1993) 988; Roemer et Friedmann, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211; Dobson et al., Neuron 5 (1990) 353; Chiocca et al., New Biol. 2 (1990) 739; Miyanojara et al., New Biol. 4 (1992) 238; WO91/18088].

- Avantageusement, le virus recombinant selon l'invention est un virus
35 défectif. Le terme "virus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer dans la

cellule-cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence de l'acide nucléique double-brin de l'invention. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il est particulièrement avantageux d'utiliser les séquences nucléiques de l'invention sous forme incorporée à un adénovirus recombinant défectif.

Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Par ailleurs, ces virus ne s'intègrent pas dans le génome des cellules qu'ils infectent, et peuvent incorporer des fragments importants d'ADN exogène. Parmi les différents sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Dans le cas des adénovirus Ad 5, les séquences nécessaires à la réplication sont les régions E1A et E1B. Comme indiqué ci-avant, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus recombinant défectif comprenant un ADN double-brin de l'invention inséré dans un gène VA.

Par ailleurs, la faible taille des ADN double-brin de l'invention permet de manière avantageuse d'incorporer simultanément, dans un même vecteur, plusieurs de ces ADN, identiques (dirigés contre le même acide nucléique-cible) ou différents (dirigés contre des acides nucléiques-cible différents). Un mode de réalisation particulier de l'invention consiste donc dans un vecteur, notamment viral, comprenant au moins deux ADN double-brin tels que définis ci-dessus.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre l'ADN double-brin tel que défini ci-avant (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917). La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome du virus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus ou d'AAV recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire

humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12%). A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP (Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460).

Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur ou un ADN double-brin tels que définis ci-dessus.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.

Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses d'ADN (ou de vecteur) utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, de l'acide nucléique à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, concernant les virus recombinants selon l'invention, ceux-ci sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

De telles compositions pharmaceutiques peuvent être utilisées chez l'homme, pour le traitement et/ou la prévention de maladies résultant d'une expression anormale de gènes (surexpression d'un gène cellulaire, expression d'un gène muté, etc), ou de maladies virales (HIV, herpes, hépatite, etc).

La présente invention a également pour objet un procédé de régulation de l'expression de gènes dans une cellule déterminée comprenant l'introduction dans ladite cellule d'un ADN double-brin tel que défini ci-avant. Cet ADN peut être administré tel quel ou, comme décrit ci-avant, après son incorporation dans un vecteur. Ce procédé de l'invention est tout particulièrement utilisable dans le cadre d'une thérapie cellulaire, pour modifier *ex vivo* l'expression de gènes sur des populations cellulaires déterminées, prélevées à partir d'un organisme, et avant leur réadministration. Il peut s'agir d'un gène dont les niveaux d'expression sont modifiés dans la pathologie concernée (ex. oncogène, gène viral), ou d'un gène dont le niveau d'expression n'est pas affecté, mais participe au développement de ladite pathologie (gène régulateur, gène GAP, GRF, etc).

La présente invention a également pour objet un procédé de régulation de l'expression de gènes *in vivo* comprenant l'administration d'une composition pharmaceutique telle que définie ci-avant.

La présente invention a également pour objet une méthode de traitement de maladies résultant d'une expression anormale de gènes comprenant l'administration d'une composition pharmaceutique telle que définie ci-avant comprenant un ADN double-brin codant pour un ARN capable de modifier l'expression desdits gènes.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Techniques générales de clonage

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC, pSP65 et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories, Promega).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

5 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de
15 PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la
20 méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

EXEMPLES

Exemple 1 : Synthèse d'ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice dirigés contre la séquence Polypurine Tract du virus HIV.

25 Cet exemple décrit la synthèse de différents ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice dirigés contre une séquence présente deux fois dans le génome du virus HIV (BRUCG). Cette séquence est localisée entre les résidus 4369-4382, et 8662-8677. Cette séquence, dite Polypurine Tract ou PPT, joue un rôle essentiel dans l'initiation de la synthèse du brin + d'ADN. La formation d'une triple-hélice au niveau
30 de cette région devrait entraîner une inhibition particulièrement efficace de l'activité polymérase, et ainsi empêcher la production de l'ADN proviral.

La région Polypurine Tract du virus HIV comprend 16 bases puriques, dont la séquence est donnée sur la SEQ ID n° 1.

- Différents ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice selon l'invention dirigés contre cette cible ont été synthétisés. La synthèse a été réalisée au moyen d'un synthétiseur automatique de nucléotides, en utilisant la chimie des phosphoramidites selon la technique décrite par Giovannangeli et al. (J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 7775). La séquence de ces ADN est donnée dans le tableau ci-après.

CIBLE PPT	5' -CCACTTTTT <u>AAAAGAAAAGGGGGGA</u> CTGG-3'		
SEQ ID n° 1	8662	8677	
ADN db	2ème région	Bras	1ère région
	5'		3'
SEQ ID n° 2	TTTTCTTTTCCCCCCT	TTTTT	TCCCCCCTTTTCTTTTAA
SEQ ID n° 3	TTTTCTTTTCCCCCCT	TTTT	TCCCCCCTTTTCTTTTAA
SEQ ID n° 4	TTTTCTTTTCCCCCCT	TTT	GTCCCCCCTTTTCTTTTAA
SEQ ID n° 5	TTTCCCCCCT	TCT	GTCCCCCCTTTT
SEQ ID n° 6	TTTGGGGGGT	TCT	GTCCCCCCTTTT
SEQ ID n° 7	TTTTCTTTTCCCCCCT	TCT	GTCCCCCCTTTTCTTTT
SEQ ID n° 8	TTTTCTTTTGGGGGGT	TCT	GTCCCCCCTTTTCTTTT

Exemple 2 : Synthèse d'ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice dirigés contre le gène gag du virus HIV.

- Cet exemple décrit la synthèse de différents ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice dirigés contre le gène gag du virus HIV, au niveau des régions comprises d'une part entre les résidus 324 et 336 (SEQ ID n° 9), et d'autre part entre les résidus 404 et 419 (SEQ ID n° 12). Le gène gag code pour des protéines de structure du virus HIV (MAp17, CAp24 et NCp15), et est donc essentiel à l'encapsidation et la production des particules virales.

- Les 2 régions du gène gag du virus HIV identifiées ci-dessus comprennent respectivement 13 et 16 bases pures.

- Différents ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice selon l'invention dirigés contre ces cibles ont été synthétisés. La synthèse a été réalisée au moyen d'un synthétiseur automatique de nucléotides, en utilisant la chimie des phosphoramidites selon la technique décrite par Giovannangeli et al. (J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 7775). La séquence de ces ADN est donnée dans le tableau ci-après.

CIBLE GAG SEQ ID n° 9	5' -GCT <u>AGAAGGAGAGAGA</u> TGGG-3'		
	324	336	
ADN db	2ème région	Bras	1ère région
	5'		3'
SEQ ID n° 10	TCTTCCTCTCTCT	TATT	TCTCTCTCCTTCTTTT
SEQ ID n° 11	TGTTGGTGTGTGT	TATT	TCTCTCTCCTTCTTTT
CIBLE GAG SEQ ID n° 12	5' -GCC <u>AGGGGGAAAGAAAAAA</u> TAT-3'		
	404	419	
SEQ ID n° 13	TCCCCCTTCTTTTTT	CTCC	TTTTTTCTTTCCCCCTTTT
SEQ ID n° 14	TCCCCCTTCTTTT	CTCC	TTTCTTTCCCCCTTTT
SEQ ID n° 15	TGGGGGTTTGTTT	CTCC	TTTCTTTCCCCCTTTT

Exemple 3 : Inhibition du cycle d'infection du HIV par les ADN double-brin de l'invention

La fonctionnalité des ADN double-brin de l'invention décrits dans les exemples 1 et 2 est mise en évidence par différents types d'expérimentation, et notamment par des études physicochimiques, par des expériences de transcription, de transcription inverse ou de traduction *in vitro*, et par mesure de l'effet sur la réplication virale.

3.1. L'étude physicochimique de l'interaction entre l'acide nucléique ciblé et l'ARN thérapeutique de l'invention permet d'obtenir des caractéristiques thermodynamiques et cinétiques du complexe formé. A cet effet, les ADN double-brin synthétisés ci-dessus ou les ARN thérapeutiques sont incubés en présence de l'acide nucléique ciblé, puis le complexe issu de cette réaction est analysé par spectroscopie d'absorption et par des expériences de retardation sur gel. Ces différentes études montrent comment chacun des ARN thérapeutiques est capable d'interagir avec sa cible respective.

3.2. Mesure de l'effet de l'ARN thérapeutique sur la transcription, la traduction et la transcription inverse d'un gène contenant la séquence-cible, placé sous le contrôle d'un promoteur (SP6, T7 ou T3). Ces expériences *in vitro* permettent de mesurer directement l'effet des ARN de l'invention sur chaque étape du cycle viral. Plus précisément, les ADN double-brin décrits ci-dessus ou les ARN composites

qu'ils codent sont incubés, dans un milieu réactionnel comprenant les constituants et les enzymes nécessaires à la transcription et/ou à la traduction, soit en présence d'un plasmide comprenant le gène de l'intégrase du virus HIV (qui contient la séquence SEQ ID n° 1) sous le contrôle du promoteur SP6 (pour les ADN de séquence SEQ ID n° 2-8), soit en présence d'un plasmide comprenant une partie du gène gag du virus HIV (qui contient les séquences SEQ ID n° 9 et 12) sous le contrôle du promoteur T7 (pour les ADN de séquence SEQ ID n° 10-11 et 13-15). Ces expériences permettent de suivre l'effet des ARN thérapeutiques de l'invention sur la transcription des gènes int et gag respectivement par les ARN polymérases SP6 et T7, et sur la production des protéines correspondantes (c'est-à-dire la traduction des ARN).

3.3. Mesure *in vivo* du taux de réplication du virus HIV en présence ou en l'absence des ADN double-brin de l'invention. Pour cela, par exemple, les ADN double-brin de l'invention sont introduits dans les lymphocytes T en culture, et les ARN codés sont exprimés (de manière stable ou transitoire). Les lymphocytes sont ensuite infectés par le virus HIV et le taux de réplication du virus est évalué par dosage de l'antigène p24.

Exemple 4 : Synthèse d'ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice dirigés contre le gène IGF-I (Insulin-like Growth Factor I).

Cet exemple décrit la synthèse de différents ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice dirigés contre le gène IGF-I, au niveau d'une région comprise entre les résidus 40 et 62 (SEQ ID n° 16).

Cette région du gène IGF-I identifiée ci-dessus comprend 23 bases puriques, et est localisée dans la partie 5' transcrite mais non traduite du gène.

Différents ADN double-brin codant pour des ARN triple-hélice selon l'invention dirigés contre cette cible ont été synthétisés. La synthèse a été réalisée au moyen d'un synthétiseur automatique de nucléotides, en utilisant la chimie des phosphoramidites selon la technique décrite par Giovannangeli et al. (J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 7775). La séquence de ces ADN est donnée dans le tableau ci-après.

CIBLE IGF-I	5' - <u>AGAAGAGGGAGAGAGAGAGAAGG</u> ... - 3'		
SEQ ID n° 16	40		62
ADN db	2ème région	Bras	1ère région
	5'		3'
SEQ ID n° 17	TCTTCTCCC (TC) 5TTCC	TCCG	CCTT (CT) 5CCCTCTTCT

REVENDICATIONS

1. ADN double-brin codant pour un ARN capable de former une triple-hélice avec un acide nucléique-cible simple-brin.

2. ADN double-brin selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il code pour un ARN composite comprenant au moins :

- une première région capable de former une double-hélice avec l'acide nucléique simple-brin ciblé ou avec une partie de celui-ci,
- une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci, et,
- un ou deux bras reliant les deux régions, chacune des régions pouvant être continue ou interrompue.

3. ADN double-brin selon les revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que la première région de l'ARN composite forme avec l'acide nucléique simple-brin ciblé une double-hélice par interaction de type Watson-Crick, puis la deuxième région forme avec cette double-hélice une triple-hélice par liaisons hydrogène (de type Hoogsteen ou Hoogsteen inverse).

4. ADN double-brin selon les revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que les deux régions de l'ARN composite forment entre-elles une double-hélice par appariement de type Watson-Crick, laquelle double-hélice interagit avec l'acide nucléique simple-brin ciblé par liaisons hydrogène (de type Hoogsteen ou Hoogsteen inverse), formant ainsi une triple-hélice.

5. ADN double-brin selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il code pour un ARN composite comprenant :

- une première région capable de former une double-hélice avec l'acide nucléique simple-brin ciblé ou avec une partie de celui-ci,
- une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci, et,
- 2 bras reliant chacune des deux régions à leurs extrémités.

6. ADN double-brin selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il code pour un ARN composite comprenant :

- une première région capable de former une double-hélice avec une région oligopurique de l'acide nucléique simple-brin ciblé,
- un bras,
- une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-
5 hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci,
- une troisième région, liée à la première, capable de former une double-hélice avec une région oligopyrimidique de l'acide nucléique simple-brin ciblé,
- un deuxième bras, et,
- une quatrième région, liée à la troisième, capable de former une triple-hélice
10 avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci.

7. ADN double-brin selon les revendications 1 à 6 caractérisé en ce que le bras comprend de 3 à 6 bases.

8. ADN double-brin selon les revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'ARN possède une longueur supérieure à 10 bases, et, de préférence, supérieure à 15
15 bases.

9. ADN double-brin selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il contient en outre des signaux permettant la transcription des ARN composites.

10. ADN double-brin selon la revendication 9 caractérisé en ce que les signaux de transcription sont constitutifs ou régulés.

20 11. ADN double-brin selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comporte un promoteur transcriptionnel contrôlé spécifiquement par l'ARN polymérase III.

25 12. ADN double-brin selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'acide nucléique-cible simple-brin est choisi parmi les ARN, tels que par exemple les ARNm, ARNt, ARNr ou ARN viral, et les ADN simple-brin ou double-brin localement ouverts.

13. ADN double-brin selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences SEQ ID n° 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15 et 17.

14. Vecteur d'expression comprenant un ADN double-brin selon l'une des revendications précédentes.

15. Vecteur selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus recombinant.

5 16. Vecteur selon la revendication 15 caractérisé en ce que le virus est choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés, le virus de l'herpès, le cytomegalovirus et le virus de la vaccine.

17. Vecteur selon l'une des revendications 15 ou 16 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus défectif.

10 18. Vecteur selon l'une des revendications 14 à 17 caractérisé en ce qu'il comprend plusieurs ADN double-brin selon l'une des revendications 1 à 13, identiques ou différents.

19. Composition pharmaceutique comprenant au moins un ADN double-brin ou un vecteur selon l'une des revendications précédentes.

15 20. Composition pharmaceutique comprenant au moins un ADN double-brin codant pour un ARN capable de former une triple-hélice avec un acide nucléique-cible simple-brin, sous forme complexée à du DEAE-dextran, à des protéines nucléaires ou à des lipides, sous forme brute ou encore incorporée à des liposomes ou à des nanoparticules.

20 21. ARN caractérisé en ce qu'il est capable de former une triple-hélice avec un acide nucléique-cible simple-brin.

22. ARN composite comprenant au moins :

- une première région capable de former une double-hélice avec un acide nucléique simple-brin cible ou avec une partie de celui-ci,

25 - une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci, et,

- un ou deux bras reliant les deux régions, chacune des régions pouvant être continue ou interrompue.

30 23. ARN composite comprenant :

- une première région capable de former une double-hélice avec un acide nucléique simple-brin ciblé ou avec une partie de celui-ci,
- une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci, et,
- 5 - 2 bras reliant chacune des deux régions à leurs extrémités.

24. ARN composite comprenant :

- une première région capable de former une double-hélice avec une région oligopurique d'un acide nucléique simple-brin ciblé,
- 10 - un bras,
- une deuxième région capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci,
- une troisième région, liée à la première, capable de former une double-hélice avec une région oligopyrimidique de l'acide nucléique simple-brin ciblé,
- 15 - un deuxième bras, et,
- une quatrième région, liée à la troisième, capable de former une triple-hélice avec la double-hélice ainsi formée ou avec une partie de celle-ci.

25. Procédé de régulation de l'expression de gènes dans une cellule déterminée comprenant l'introduction dans ladite cellule d'un ADN double-brin ou d'un
- 20 vecteur selon l'une des revendications 1 à 18.

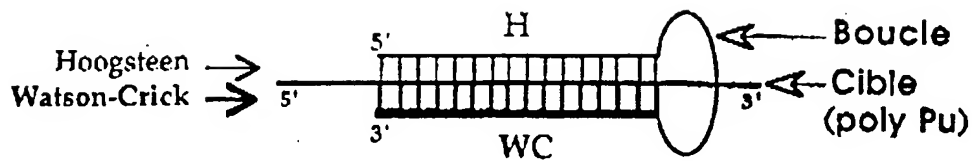


Fig. 1a

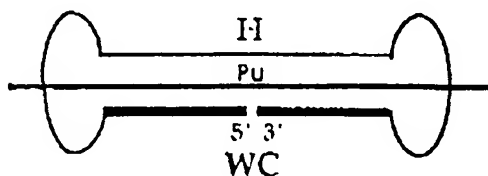


Fig. 1b

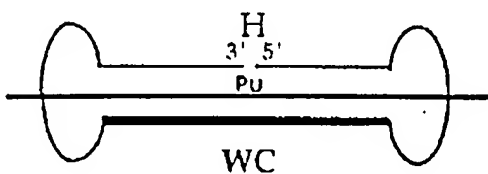


Fig. 1c

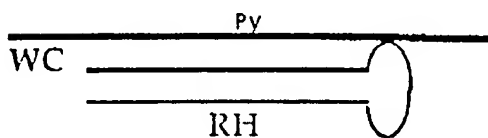


Fig. 2

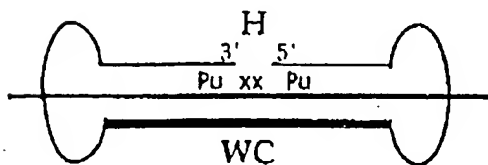


Fig. 3a

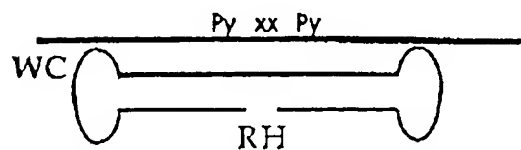


Fig. 3b

2 / 2

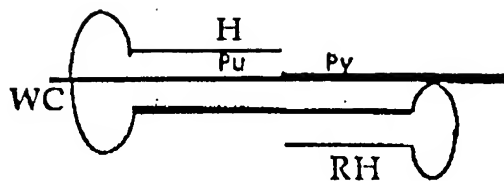


Fig. 4a

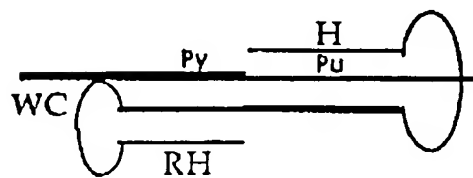


Fig. 4b

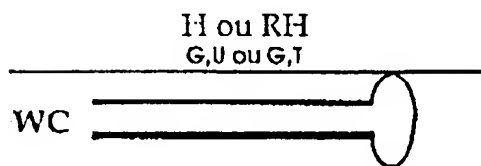


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/01536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/11 C12N15/86 C07H21/02 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07H A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 90 (21). 1993. 10013-10017, GIOVANNANGELI, C. ET AL. 'Oligonucleotide clamps arrest DNA synthesis on a single - stranded DNA target.' see the whole document ---	1-4, 7-12, 14-19, 21,22,25
Y	FR,A,2 687 411 (UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS) 20 August 1993 cited in the application see the whole document --- -/--	1-12, 14-25



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 1995

Date of mailing of the international search report

11-05-1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/FR 94/01536

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,92 19732 (GENSET) 12 November 1992 see page 17, line 11 - page 18, line 4 see page 24, line 35 - page 25, line 33 see page 33 see figures 1,5 see claims ---	1,2,5, 20,23
Y	WO,A,91 06626 (GILEAD SCIENCES, INC.) 16 May 1991 see page 4, line 31 - page 5, line 35 see example 8 see claims ---	1,2,6,24
A	J AM CHEM SOC 113 (20). 1991. 7775-7777, GIOVANNANGELI, C. ET AL. 'SINGLE - STRANDED DNA AS A TARGET FOR TRIPLE - HELIX FORMATION.' cited in the application see the whole document ---	1-4,21, 22
A	WO,A,93 12230 (SRI INTERNATIONAL) 24 June 1993 see page 8, line 25 - line 31 see page 28, line 34 - page 33, line 32 see claims 19-23; figures 12B,13 ---	1
T	PURE & APPLIED CHEMISTRY, vol. 66,no. 4, 1994 pages 663-669, HELENE, C. 'Rational design of sequence-specific DNA ligands for artificial control of gene expression' see page 667, paragraph 3 see figure 4 ---	1-4
T	GENE, vol. 149, 4 November 1994 AMSTERDAM NL, pages 115-121, KANDIMALLA, E. & AGRAWAL, S. 'Single-stranded-targeted triplex formation: stability, specificity and RNase H activation properties ' see figure 1 -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/01536

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Note: Although claim 25 (for as long as it is related to in vivo methods) concerns a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the effects attributable to the product (to the composition).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/FR 94/01536

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2687411	20-08-93	NONE	
WO-A-9219732	12-11-92	FR-A- 2675803	30-10-92
		AU-A- 1759692	21-12-92
		CA-A- 2102229	26-10-92
		EP-A- 0581848	09-02-94
		JP-T- 6506834	04-08-94
WO-A-9106626	16-05-91	US-A- 5399676	21-03-95
		AU-B- 641219	16-09-93
		AU-A- 7148191	31-05-91
		EP-A- 0539371	05-05-93
		JP-T- 5505101	05-08-93
WO-A-9312230	24-06-93	WO-A- 9312234	24-06-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 94/01536

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/11 C12N15/86 C07H21/02 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07H A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 90 (21). 1993. 10013-10017, GIOVANNANGELI, C. ET AL. 'Oligonucleotide clamps arrest DNA synthesis on a single - stranded DNA target.' voir le document en entier ---	1-4, 7-12, 14-19, 21,22,25
Y	FR,A,2 687 411 (UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS) 20 Août 1993 cité dans la demande voir le document en entier --- -/--	1-12, 14-25

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Avril 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11-05-1995

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 94/01536

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WO,A,92 19732 (GENSET) 12 Novembre 1992</p> <p>voir page 17, ligne 11 - page 18, ligne 4 voir page 24, ligne 35 - page 25, ligne 33 voir page 33 voir figures 1,5 voir revendications</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,5, 20,23
Y	<p>WO,A,91 06626 (GILEAD SCIENCES, INC.) 16 Mai 1991</p> <p>voir page 4, ligne 31 - page 5, ligne 35 voir exemple 8 voir revendications</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,6,24
A	<p>J AM CHEM SOC 113 (20). 1991. 7775-7777, GIOVANNANGELI, C. ET AL. 'SINGLE - STRANDED DNA AS A TARGET FOR TRIPLE - HELIX FORMATION.'</p> <p>cité dans la demande voir le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,21, 22
A	<p>WO,A,93 12230 (SRI INTERNATIONAL) 24 Juin 1993</p> <p>voir page 8, ligne 25 - ligne 31 voir page 28, ligne 34 - page 33, ligne 32 voir revendications 19-23; figures 12B,13</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1
T	<p>PURE & APPLIED CHEMISTRY, vol. 66,no. 4, 1994 pages 663-669, HELENE, C. 'Rational design of sequence-specific DNA ligands for artificial control of gene expression'</p> <p>voir page 667, alinéa 3 voir figure 4</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4
T	<p>GENE, vol. 149, 4 Novembre 1994 AMSTERDAM NL, pages 115-121, KANDIMALLA, E. & AGRAWAL, S. 'Single-stranded-targeted triplex formation: stability, specificity and RNase H activation properties'</p> <p>voir figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-4

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 94/ 01536

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°^{es} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque : Bien que la revendication 25 (pour autant que relative à des méthodes in vivo) concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n°^{es} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°^{es} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

1. administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{es}:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{es}:

Remarque quant à la réserve

☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No
PCT/FR 94/01536

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2687411	20-08-93	AUCUN	
WO-A-9219732	12-11-92	FR-A- 2675803	30-10-92
		AU-A- 1759692	21-12-92
		CA-A- 2102229	26-10-92
		EP-A- 0581848	09-02-94
		JP-T- 6506834	04-08-94
WO-A-9106626	16-05-91	US-A- 5399676	21-03-95
		AU-B- 641219	16-09-93
		AU-A- 7148191	31-05-91
		EP-A- 0539371	05-05-93
		JP-T- 5505101	05-08-93
WO-A-9312230	24-06-93	WO-A- 9312234	24-06-93

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.